

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D - 1 JUN 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 19 045.7

**Anmeldetag:** 25. April 2003

**Anmelder/Inhaber:** november Aktiengesellschaft Gesellschaft  
für Molekulare Medizin, 91056 Erlangen/DE

**Bezeichnung:** Vorrichtung und Verfahren zur Aufbereitung  
Biopolymer-haltiger Flüssigkeiten

**IPC:** C 12 M, G 01 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 29. April 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Agurke

## Vorrichtung und Verfahren zur Aufbereitung Biopolymer-haltiger Flüssigkeiten

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur kontaminationsfreien Aufbereitung Biopolymer-haltiger Probenflüssigkeiten.

10 Der Nachweis von Biopolymeren, wie DNA, RNA, Proteinen und dgl., ist in der medizinischen Diagnostik und Umweltanalytik von ständig steigender Bedeutung. Die Biopolymere liegen in den natürlichen Probenflüssigkeiten wie z. B. Blutproben häufig in einer Form vor, die für einen direkten Nachweis der Biopolymere ungeeignet sind. Daher ist eine Probenvorbereitung  
15 notwendig, die Biopolymere einer Analyse zugänglich macht. Durch eine Probenvorbereitung können z. B. Biopolymere von den Nachweis der Biopolymere störenden Stoffen abgetrennt werden, weiterhin können die Biopolymere z. B. durch Aufschluss von Zellen freigesetzt werden oder aus verdünnten  
20 Flüssigkeiten konzentriert werden und somit einer Analyse zugänglich gemacht werden. Z. Zt. erfordern die herkömmlichen Verfahren der Probenvorbereitung eine Vielzahl manueller Schritte, zu deren Durchführung Fachpersonal notwendig ist. Dies macht den Nachweis der Biopolymere aufwändig und teuer. Weiterhin ist bei einer manuellen Probenvorbereitung eine Kontamination der Probe nicht ausgeschlossen. Darüber hinaus kann bei den gebräuchlichen Verfahren eine Freisetzung von gefährlichem Material, wie z. B. Viren und Bakterien, in die Umwelt nicht ausgeschlossen werden.

30 Die US 6,440,725 B1 beschreibt eine Vorrichtung zur Aufbereitung Nukleinsäuren enthaltender Proben. Dabei wird die Probe in einer Kammer zum Aufschluss der die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen mit Ultraschall behandelt. Zum Abtrennen der  
35 Zellbruchstücke wird die Flüssigkeit anschließend durch einen

Filter gedrückt. Dabei kommt es nachteiligerweise mitunter zur Verstopfung des Filters.

Die WO 00/75623 A1 beschreibt eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zur Extraktion von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit. Mit der vorgeschlagenen Vorrichtung soll insbesondere das Problem des Zusetzens eines Filters vermieden werden. Es wird dazu eine Spritze vorgeschlagen, in der ein Filtermaterial aufgenommen ist. Die Porosität des Filtermaterials ist so eingestellt, dass es durch Zellbruchstücke nicht verstopft werden kann. Das Filtermaterial ist ferner so ausgeführt, dass beim Durchsaugen der Flüssigkeit DNA daran gebunden wird. Die vorgeschlagene Vorrichtung ist in vielfacher Hinsicht nachteilig. Es kann auch hier zum Verstopfen des Filters kommen. Ferner ist zur Durchführung des Verfahrens ein durch die Spritze vorgegebenes Mindestvolumen erforderlich. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die an das Filtermaterial gebundenen Biopolymere beim Herausdrücken der Flüssigkeit aus der Spritze zum Teil wieder gelöst werden. Schließlich ist es mit der vorgeschlagenen Vorrichtung nicht möglich, in der Flüssigkeit enthaltene Zellen automatisch aufzuschließen. Der Aufschluss muss in einem gesonderten vorgeschalteten Schritt erfolgen.

Das US-Patent 6,197,595 B1 und die dazu korrespondierende US-Patentanmeldung 2001/0036672 A1 betreffen ein Verfahren zum Führen einer flüssigen Probe in einem miniaturisierten Fluidsystem. Das miniaturisierte Fluidsystem umfasst zumindest eine erste und eine zweite Kammer, die zur Herstellung einer Flüssigkeitsverbindung mit einem Kanal verbunden sind. In der Flüssigkeitsverbindung sind mindestens ein erstes und ein zweites steuerbares Ventil angeordnet. Zum Bewegen der Flüssigkeit in dem Fluidsystem ist eine Über- und/oder Unterdruckquelle vorgesehen. Durch geeignete Steuerung der Ventile kann wiederkehrend Über- und/oder Unterdruck auf die Flüssig-

keit ausgeübt und damit Flüssigkeit von einer in die nächste Kammer bewegt werden. Als Über- und/oder Unterdruckquelle wird eine Membranpumpe verwendet, mit der sämtliche Kammern verbunden sind. Als Alternative werden auch eine Gasüberdruckvorrichtung und eine Vakuumvorrichtung genannt. Das nach dem Stand der Technik bekannte miniaturisierte Fluidsystem ist aufwändig herzustellen. In jedem Fall müssen zur Drucksteuerung mehrere steuerbare Ventile vorgesehen sein. Abgesehen davon, kommt es bei einer Erzeugung mittels Gasüberdruck unerwünschterweise dazu, dass sich Gas in der Probe oder in den Analyseflüssigkeiten löst. Zum Entgasen der Flüssigkeiten muss infolgedessen eine besondere Entgasungskammer vorgesehen werden. Abgesehen davon, ist ein Bewegen der Flüssigkeit mittels Gasüberdruck durch das miniaturisierte Fluidsystem infolge der Kompressibilität von Gasen nicht besonders exakt. Schließlich ist es bei dem miniaturisierten Fluidsystem nach dem Stand der Technik erforderlich, für jede Reaktion eine besondere Kammer vorzusehen. Die Probe wird zur Bearbeitung von einer Kammer in die nächste Kammer befördert. Das Vorsehen einer Vielzahl von Kammern erfordert einen hohen Herstellungsaufwand.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere eine Vorrichtung und ein Verfahren angegeben werden, mit denen zuverlässig und automatisiert eine Aufbereitung Biopolymer-haltiger Flüssigkeiten möglich ist. Das Verfahren soll insbesondere so angelegt sein, dass eine Kontamination der Probe und der Umwelt weitestgehend ausgeschlossen ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 26 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 25 und 27 bis 43.

Nach Maßgabe der Erfindung ist eine Vorrichtung zur kontaminationsfreien Aufbereitung Biopolymer-haltiger Probenflüssigkeiten vorgesehen, mit einer ersten und einer zweiten Kammer, die über einen Kanal verbunden sind, wobei die erste Kammer ein Mittel zum reversiblen Verändern ihres Volumens und die zweite Kammer ein reversibel veränderbares Volumen aufweist, wobei ein mit dem Kanal oder einer der Kammern verbundener Anschluss zum Beladen der ersten oder der zweiten Kammer mit einer Probenflüssigkeit vorgesehen ist und wobei die Kammern und der Kanal als Einwegvorrichtung ausgebildet sind.

Die vorgeschlagene Vorrichtung ermöglicht eine automatisierte Aufbereitung Biopolymer-haltiger Flüssigkeiten. Sie gewährleistet insbesondere eine kontaminationsfreie Aufbereitung der Probenflüssigkeiten. Die Kontaminationsfreiheit wird gewährleistet durch die nach außen hin geschlossenen Kammern, die lediglich innerhalb des gemeinsamen Gehäuses über einen Kanal verbunden sind. Die Vorrichtung ist zur Erleichterung einer kontaminationsfreien Verfahrensweise als Einwegvorrichtung, ausgebildet, d.h. sie wird nach der Aufbereitung der jeweiligen Probenflüssigkeit verworfen. Dabei können die nicht weiterverwandten Flüssigkeitsvolumina innerhalb der Vorrichtung verbleiben. Dadurch wird eine mögliche Kontamination der Umwelt mit eventuell in der Probe vorhandenen gefährlichen Stoffen vermieden. Die Vorrichtung weist keinen Filter auf. Es kann nicht zur Verstopfung kommen. Eine zuverlässige automatisierte Aufbereitung ist damit sicher gestellt.

Bei der vorgeschlagenen Vorrichtung wird die Flüssigkeit durch einfaches Ändern des Volumens der Kammern von einer Kammer in die nächste transportiert. Die Flüssigkeit kann darüber hinaus durch reversibles Ändern des Volumens der Kammern wiederholend von der ersten in die zweite Kammer und zurück bewegt werden. Zum Bewegen der Flüssigkeit mittels re-

versibler Volumenänderung der Kammern ist es nicht erforderlich, besondere steuerbare Ventile vorzusehen. Im Gegensatz zu den nach dem Stand der Technik bekannten zentralen Über- und/oder Unterdruckvorrichtung und steuerbaren Ventile sind nach dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Kammern so ausgebildet, dass ihr Volumen änderbar ist. Durch eine geeignete Vergrößerung und Verkleinerung der Volumen der Kammern ist eine exakte Bewegung der Flüssigkeit innerhalb des Systems ohne großen Aufwand möglich. Dabei wird insbesondere ein unerwünschter Gaseinschluss vermieden. Besondere Entgaskammern sind nicht erforderlich. Die vorgeschlagene Vorrichtung kann relativ wenige Kammern aufweisen. Ein und dieselbe Kammer kann mehrfach für unterschiedliche Reaktionen verwendet werden. Die Kammern können je nach durchzuführender Reaktion auf ein bestimmtes maximales Volumen eingestellt werden.

Unter Biopolymer-haltigen Probenflüssigkeiten werden Flüssigkeiten verstanden, in denen Biopolymere wie DNA, RNA, Proteine und dgl. enthalten sind. Die Biopolymere können dabei in freier Form in der Probenflüssigkeit vorliegen oder z. B. in Zellen enthalten sein. Sie können aber auch von anderem organischen Material umgeben sein.

Eine Kammer mit einem reversibel veränderbaren Volumen kann beispielsweise aus einem elastischen Material, wie einem Gummiballon, hergestellt sein. Wenn in eine solche Kammer unter einem Überdruck eine Flüssigkeit geführt wird, so entlädt sich die Flüssigkeit bei Entspannen des Überdrucks infolge der elastischen Kontraktion des Gummiballons. Eine vollständige Entleerung der Kammer kann durch Zusammendrücken des Gummiballons erfolgen. Dazu kann ein Mittel zum reversiblen Verändern des Volumens vorgesehen sein. Es kann sich dabei um einen Stempel oder dgl. handeln. Bei einer konstruktiv relativ einfach herstellbaren Vorrichtung weisen sämtliche Kam-

mern ein Mittel zum reversiblen Ändern ihres Volumens auf. Damit kann die Flüssigkeit in der Vorrichtung beliebig geführt werden. Das Vorsehen besonderer Ventile ist dazu nicht erforderlich.

5

Die Einwegvorrichtung kann ein nach Art einer Einwegkassette ausgebildetes Gehäuse aufweisen, welches vorzugsweise aus Kunststoff hergestellt ist. Das Gehäuse kann einstückig ausgebildet sein.

10

Nach einer weiteren Ausgestaltung ist die erste Kammer als erster Zylinder ausgeführt, und das Mittel zum Verändern des Volumens ist ein im ersten Zylinder geführter erster Kolben. Die zweite Kammer kann als zweiter Zylinder mit einem darin geführten zweiten Kolben ausgeführt sein. Die Kolben können gegen ein vollständiges Herausziehen aus den Zylindern mechanisch gesichert sein. Dazu können z. B. am Öffnungsrand der Zylinder Rastungen oder ein umlaufender Wulst vorgesehen sein. Zweckmäßigerweise öffnen sich der erste und der zweite Zylinder zum Rand des Gehäuses hin, so dass die Kolben von außen her betätigbar sind. Das ermöglicht einen Einsatz der Vorrichtung in einer automatischen Stelleinrichtung, in der die Kolben z. B. mit Linearstellelementen gemäß einem vorgegebenen Programm automatisch betätigt werden.

15

20

25

Nach einer vorteilhaften Ausgestaltung erstreckt sich von einem dem ersten Kolben gegenüberliegenden Ende des ersten Zylinders ein erster Kanal, der mit einem am Gehäuse vorgesehenen ersten Anschluss verbunden ist. Ferner kann sich von einem dem zweiten Kolben gegenüberliegenden Ende des zweiten Zylinders ein zweiter Kanal erstrecken, der mit dem ersten Kanal oder der ersten Kammer verbunden ist.

30

35

Nach einer Ausgestaltung ist am Gehäuse ein mit dem zweiten Kanal in Verbindung stehender zweiter Anschluss vorgesehen.

Das Vorsehen eines zweiten Anschlusses ermöglicht es, die aufbereitete Probenflüssigkeit durch den zweiten Anschluss zu entladen. Damit wird vermieden, dass die aufbereitete Probenflüssigkeit durch am ersten Anschluss z. B. beim Beladen verbliebene Kontaminationen verunreinigt wird.

10 Nach einer weiteren Ausgestaltung kann mindestens eine weitere Kammer mit einem, vorzugsweise reversibel, veränderbaren Volumen vorgesehen sein, die über den ersten oder zweiten Kanal mit der ersten und/oder zweiten Kammer verbunden ist. Die weitere Kammer kann als ein im Gehäuse vorgesehener weiterer Zylinder mit einem darin geführten weiteren Kolben ausgebildet sein, der an einem dem weiteren Kolben gegenüberliegenden Ende einen weiteren Kanal aufweist, der mit dem ersten  
15 und/oder zweiten Kanal verbunden ist. Das Vorsehen einer weiteren Kammer in Verbindung mit dem ersten und/oder zweiten Kanal ermöglicht das Vorlegen von zur Durchführung der Aufbereitung erforderlichen Lösungen.

20 Vorteilhafterweise liegen die Achsen der Zylinder in einer Ebene. Die Achsen der Zylinder können insbesondere parallel angeordnet sein. Das vereinfacht die Ausführung einer Einrichtung zur automatischen Betätigung der Kolben.

25 Nach einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung ist in einer der Kammern eine Flüssigkeit zum Aufschließen von die Biopolymere enthaltender organischer Substanz, insbesondere Zellen, aufgenommen. Ferner können in einer der Kammern magnetische Partikel aufgenommen sein, die an ihrer Oberfläche Biopolymere binden können. Die magnetischen Partikel weisen  
30 zweckmäßigerweise einen Durchmesser im Bereich von 50 nm bis 50  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 200 nm bis 20  $\mu\text{m}$ , auf. Solche magnetischen Partikel sind auch unter dem Begriff "magnetic beads" bekannt.

35



Der Durchmesser der magnetischen Partikel ist zweckmäßigerweise kleiner als ein Durchmesser der Kanäle, so dass die magnetischen Partikel durch die Kanäle bewegbar sind. Damit wird eine Verstopfung der Kanäle bei einem Hin- und Herpumpen der Probenflüssigkeit vermieden. Zweckmäßigerweise ist ein Verhältnis des Durchmessers der magnetischen Partikel zum Durchmesser des Kanals/der Kanäle kleiner als 1:5, vorzugsweise kleiner als 1:10, besonders vorzugsweise kleiner als 1:50.

In einer der Kammern kann eine Elutionsflüssigkeit aufgenommen sein. Ferner kann in mindestens einer der Kammern eine Waschflüssigkeit aufgenommen sein. Es ist auch möglich, dass in verschiedenen Kammern verschiedene Waschflüssigkeiten oder Waschpuffer vorgelegt sind. Das Vorsehen von verschiedenen zum Aufbereiten der Probenflüssigkeit erforderlichen Flüssigkeiten sowie der magnetischen Partikel vereinfacht die Aufbereitung. Die Flüssigkeiten müssen nicht erst in die Vorrichtung eingefüllt werden. Es ist lediglich erforderlich, der Vorrichtung die aufzubereitende Probenflüssigkeit zuzuführen. Aus der Vorrichtung kann dann die fertig aufbereitete Probe abgegeben werden.

Nach einer weiteren Ausgestaltung können der/die Anschluss/Anschlüsse jeweils mit einem Verschluss verschlossen sein. Der/die Anschluss/Anschlüsse können des Weiteren jeweils mit einem Ventil versehen sein. Bei dem Verschluss kann es sich um ein Septum handeln, das beispielsweise mit einer Kanüle einer die aufzubereitende Probenflüssigkeit enthaltenden Injektionsspritze durchstoichen werden kann. Bei geschlossenem/n Anschluss/Anschlüssen sind die Kammern zweckmäßigerweise gas- und flüssigkeitsdicht gegenüber der Umgebung abgeschlossen. Damit wird eine kontaminationsfreie Aufbereitung der Probenflüssigkeit sichergestellt.

Nach einer weiteren Ausgestaltung weist das Gehäuse ein Mittel zum Anbringen in einer korrespondierenden Aufnahme einer Einrichtung zum automatischen Ändern des Volumens mindestens einer der Kammern auf. Bei dem Mittel kann es sich um eine Ausnehmung, um einen Vorsprung oder dgl. handeln, die/der mit einer korrespondierenden Struktur in der Aufnahme zusammenwirkt. Das Mittel kann ein Verrasten der Vorrichtung ermöglichen. Eine solche Rastverbindung kann schnell gelöst werden. Es sind dazu keine Werkzeuge erforderlich.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zum kontaminationsfreien Aufbreiten Biopolymer-haltiger Probenflüssigkeiten mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit folgenden Schritte vorgesehen:

Einführen eines vorgegebenen Volumens der Probenflüssigkeit durch den ersten Anschluss in die erste oder die zweite Kammer,

Unterbrechung einer durch den ersten Anschluss gerichteten Strömung,

Hin- und Herbewegen der Probenflüssigkeit zwischen der ersten und der zweiten Kammer, so dass die Probenflüssigkeit mit magnetischen Partikeln gemischt, und die in der Probenflüssigkeit enthaltenen Biopolymere an die magnetischen Partikel gebunden werden,

Entladen der Biopolymere über einen Anschluss.

Das vorgeschlagene Verfahren ermöglicht zuverlässig eine automatische Aufbereitung Biopolymer-haltiger Probenflüssigkeiten. Nach der Unterbrechung der durch den ersten Anschluss gerichteten Strömung wird die Probenflüssigkeit durch den die beiden Kammern verbindenden Kanal bewegt. Dazu wird das Volu-

men der ersten Kammer verkleinert und gleichzeitig im selben Ausmaß das Volumen der zweiten Kammer vergrößert. Eine Kontamination oder ein Gasanschluss sind ausgeschlossen. Die Kammern und der Kanal bilden ein in sich abgeschlossenes System.  
5 Die Bewegung der Flüssigkeiten im System erfolgt jeweils durch eine Volumenänderung der miteinander korrespondierenden Kammern.

10 Zweckmäßigerweise können vor dem Einführen eines vorgegebenen Volumens der Probenflüssigkeit sämtliche Kanäle der Vorrichtung blasenfrei mit Flüssigkeit, beispielsweise mit destilliertem Wasser, gefüllt werden. Nach dem Einführen der Probenflüssigkeit wird die Vorrichtung zweckmäßigerweise flüssigkeitsdicht geschlossen. So kann eine Kontamination während  
15 der Aufbereitung sicher vermieden werden.

Das Abtrennen der Biopolymere erfolgt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung frei in der Probenflüssigkeit beweglicher magnetischer Partikel. Das ermöglicht eine  
20 Automatisierung des Verfahrens. Ein Zusetzen der nach dem Stand der Technik bekannten Filter wird sicher vermieden.

25 Zum Unterbrechen einer durch den ersten Anschluss gerichteten Strömung ist es nicht unbedingt erforderlich, den ersten Anschluss zu sperren. Es genügt, dass mit dem ersten Anschluss ein mit einer Flüssigkeit gefüllter geschlossener Behälter, z.B. eine Injektionsspritze, verbunden und dessen Volumen konstant gehalten wird. In diesem Fall können zwar Moleküle bedingt durch die Diffusion durch den Anschluss gelangen; ei-  
30 ne gerichtete, d.h. aus oder in die Kammer weisende, Strömung ist gleichwohl unterbunden.

Bei den Biopolymeren kann es sich um Nukleinsäuren handeln. Die Biopolymere können über den ersten Anschluss oder den  
35 zweiten Anschluss entladen werden. Ein Entladen über den

zweiten Anschluss ist bevorzugt. Eine Verunreinigung durch im ersten Anschluss verbliebene Probenflüssigkeit kann damit vermieden werden. Die Biopolymere können je nach Bedarf gebunden an die magnetischen Partikel oder getrennt von den magnetischen Partikeln entladen werden.

Nach einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung sind die magnetischen Partikel in einer der Kammern vorgelegt. Damit entfällt ein gesondertes Bereitstellen der magnetischen Partikel. Die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination wird damit verringert.

Besonders einfach lässt sich das Verfahren automatisieren, wenn die Probenflüssigkeit durch abwechselndes Vergrößern und Verkleinern des Volumens der ersten Kammer hin- und herbewegt wird. Die Probenflüssigkeit kann z. B. durch abwechselndes Drücken des ersten und zweiten Kolbens hin- und herbewegt werden. In diesem Fall sind zum Bewegen der Kolben lediglich von außen in das Gehäuse eingreifende Druckstangen erforderlich. Die Kolben müssen zum Hin- und Herbewegen der Flüssigkeit insbesondere nicht gezogen werden.

Nach einer Ausgestaltung wird die Probenflüssigkeit zum Aufschließen mit einer, vorzugsweise in einer der Kammern vorgelegten, Flüssigkeit zum Aufschließen gemischt. Alternativ dazu kann die Probenflüssigkeit zum Aufschließen auch mit Ultraschall behandelt werden.

Nach einer weiteren Ausgestaltung werden die magnetischen Partikel mit den daran gebundenen Biopolymeren durch Erzeugen eines Magnetfelds in einem vorgegebenen Abschnitt einer, vorzugsweise der ersten oder zweiten, Kammer gehalten und dann eine um den an die magnetischen Partikel gebundenen Anteil der Biopolymere verarmte Restflüssigkeit aus der betreffenden Kammer zu einem wesentlichen Teil entfernt. Damit kann auf

einfache Weise eine Anreicherung der an den magnetischen Partikeln haftenden Biopolymere erreicht werden.

5 Der vorgegebene Abschnitt befindet sich zweckmäßiger an einer Position, an der beim Bewegen der Flüssigkeit zwischen der ersten und zweiten Kammer starke Strömungen und Verwirbelungen auftreten. Besonders gut dafür ist ein Abschnitt in der Nähe der Öffnung eines Kanals geeignet. Dort wird eine starke Verwirbelung der Partikel erreicht, welche ein effektives Waschen der Partikel und eine effektive Elution der Biopolymere ermöglicht.

10 Nach einer weiteren Ausgestaltung kann eine in einer weiteren Kammer vorgelegte Waschflüssigkeit mit den magnetischen Partikeln, vorzugsweise durch Hin- und Herbewegen der Waschflüssigkeit zwischen der Kammer und der weiteren Kammer gemischt werden. In diesem Fall können die magnetischen Partikel durch erneutes Erzeugen eines Magnetfelds in dem vorgegebenen Abschnitt gehalten und dann die Waschflüssigkeit aus der betreffenden Kammer zu einem wesentlichen Teil entfernt werden. Das ermöglicht eine weitere Aufreinigung der an den magnetischen Partikeln gebundenen Biopolymere. Es kann damit vorteilhafterweise auch eine Abtrennung von PCR-Inhibitoren erreicht werden.

25 Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal kann eine in einer weiteren Kammer bereitgehaltene Elutionsflüssigkeit mit den magnetischen Partikeln, vorzugsweise durch Hin- und Herbewegen der Elutionsflüssigkeit zwischen der Kammer und der weiteren Kammer, gemischt werden. Es können wiederum die magnetischen Partikel durch erneutes Erzeugen eines Magnetfelds in dem vorgegebenen Abschnitt gehalten und dann die die Biopolymere enthaltende Elutionsflüssigkeit aus der betreffenden Kammer zu einem wesentlichen Teil entfernt und über einen An-

schluss aus der Vorrichtung entladen werden. In der Elutionsflüssigkeit liegen die Biopolymere extrahiert vor.

Die Elutionsflüssigkeit kann zum Nachweis der darin enthaltenen Biopolymere verwendet werden. Es ist insbesondere möglich, die Elutionsflüssigkeit ohne weitere manuelle Tätigkeit automatisch einer herkömmlichen Vorrichtung zum automatischen Nachweis von Biopolymeren zuzuführen. Die Konzentration der in der entladenen Elutionsflüssigkeit enthaltenen Biopolymere kann wesentlich höher sein als die in der Probenflüssigkeit. Die Elutionsflüssigkeit ist frei von den Nachweis der Biopolymere störenden Stoffen.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal können zu verworfende Proben-/Rest-/Waschflüssigkeit oder die magnetischen Partikel in einer der weiteren Kammern gesammelt und nach dem Entladen, vorzugsweise zusammen mit dem Gehäuse, verworfen werden.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine erste Vorrichtung,

Fig. 2 eine zweite Vorrichtung und

Fig. 3a - h ein erfindungsgemäßen Verfahren anhand einer dritten Vorrichtung.

In Fig. 1 ist in Draufsicht sowie in Querschnittsansichten eine erste Vorrichtung gezeigt. In einem aus einem transparenten Kunststoff hergestellten Gehäuse 1 sind ein erster Zylinder 2 und ein zweiter Zylinder 3 vorgesehen. Im ersten Zylinder 2 ist ein erster Kolben 4 und im zweiten Zylinder 3 ein zweiter Kolben 5 verschiebbar aufgenommen. Die Kolben

können mit Kolbenstangen versehen sein. Es ist aber auch möglich, dass die Kolben lediglich zylindrisch ausgebildet sind, d.h. es sind die Kolbenstangen weggelassen. Die Kolben 4, 5 können z. B. aus Gummi oder Kunststoff hergestellt sein. Sie dichten die damit abgeschlossenen Kammern zuverlässig gegenüber der Umgebung gegen das Eindringen von Kontaminationen ab. Der erste 4 und der zweite Kolben 5 bilden zusammen mit dem ersten 2 und zweiten Zylinder 3 eine erste und eine zweite Kammer, deren Volumen veränderbar ist. Von einem dem ersten Kolben 4 gegenüberliegenden Ende des ersten Zylinders 2 erstreckt sich ein erster Kanal 6, der in einen am Rand des Gehäuses 1 vorgesehenen ersten Anschluss 7 mündet. Von einem dem zweiten Kolben 5 gegenüberliegenden Ende des zweiten Zylinders 3 erstreckt sich ein zweiter Kanal 8, der in einen zweiten Anschluss 9 am Rand des Gehäuses 1 mündet. Der zweite Kanal 8 ist über einen Verbindungskanal 10 mit dem ersten Zylinder 2 und über den ersten Zylinder 2 mit dem ersten Kanal 6 verbunden. In der Verbindung zwischen der ersten und zweiten Kammer ist kein Ventil vorgesehen. Ein dritter Anschluss 11 kann über einen dritten Kanal 12 mit dem ersten Zylinder 2 verbunden sein. Die Zylinder 2, 3 können an den Enden, von denen sich die Kanäle 6, 8 erstrecken z. B. spitz zulaufend ausgebildet sein. Der Kolben kann auch spitz zulaufend sein, so dass das Restvolumen sehr klein ist. Im Falle der Verwendung zylindrischer Kolben 4, 5 verbleibt somit bei vollständig eingeschobenem Kolben 4, 5 das Restvolumen im Zylinder 2, 3. In dem Restvolumen können vorteilhafterweise die magnetischen Partikeln mittels des Magnetfelds festgehalten und dort angereichert werden.

Die Vorrichtung kann ferner mit vier Durchbrüchen 13 zur Befestigung in einer Aufnahme einer Einrichtung (hier nicht gezeigt) zur automatischen Betätigung der Kolben 4, 5 versehen sein.

In Fig. 2 ist eine zweite erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt. Im Gegensatz zu der in Fig. 1 gezeigten ersten Vorrichtung verbindet hier der Verbindungskanal 10 den ersten Kanal 6 mit dem zweiten Kanal 8. Die Zylinder 2, 3 sind im Bereich der Kanäle 6, 8 nicht spitz zulaufend ausgebildet. In Fig. 2 sind ferner Schubstangen 14 gezeigt, die Bestandteil einer hier nicht näher erläuterten Einrichtung zur automatischen Betätigung der Kolben 4, 5 sind. Die in Fig. 2 gezeigte Vorrichtung umfasst neben dem ersten 2 und dem zweiten Zylinder 3 drei weitere Zylinder 15, die jeweils mit weiteren Kolben 16 versehen sind. Jede der weiteren Zylinder 15 weist an einem den weiteren Kolben 16 gegenüberliegenden Ende der weiteren Zylinder 15 einen sich erstreckenden weiteren Kanal 17 auf, der mit dem Verbindungskanal 10 verbunden ist.

In der zweiten Kammer sind hier eine Lyseflüssigkeit L und "magnetic beads" bzw. magnetische Partikel 18 vorgelegt. Eine der weiteren Zylinder 15 und Kolben 16 bildenden weiteren Kammern enthält Waschflüssigkeit W, eine andere weitere Kammer eine Elutionsflüssigkeit E. Die in der Mitte der Vorrichtung vorgesehene weitere Kammer dient der Aufnahme von zu verwerfenden Flüssigkeiten. Die erste Kammer dient der Aufnahme einer (hier nicht gezeigten) Probenflüssigkeit.

Das Verfahren wird nun anhand der in Fig. 3a bis 3h gezeigten dritten Vorrichtung näher erläutert. Die dritte Vorrichtung ist ähnlich der in Fig. 2 gezeigten zweiten Vorrichtung ausgestaltet. Es fehlen hier lediglich die weiteren Kammern 15.

In Fig. 3a ist der erste Kolben 4 vollständig in den ersten Zylinder 2 eingeschoben. Die erste Kammer hat in diesem Zustand praktisch kein Volumen. In dem zweiten Zylinder 3 ist der zweite Kolben 5 etwa zur Hälfte eingeschoben. In der so gebildeten zweiten Kammer sind die Lyseflüssigkeit L sowie die magnetischen Partikel 18 vorgelegt. Die magnetischen Par-



tikel 18 sind derart beschichtet, dass daran die nachzuweisenden Biopolymere binden können. Die Oberfläche der magnetischen Partikel 18 kann Stoffe wie Silika oder Glasmilch enthalten. Solche Stoffe binden Nukleinsäuren. Weiterhin können auf der Oberfläche der superparamagnetischen Partikel 18 spezifische Liganden, wie Antikörper, Kohlenhydrate, Peptide, Thiole, Metall-Ionen, peptidomimetische Stoffe, Lipide, Phospholipide, Lectine, Antigene, Rezeptoren oder Oligonukleotide gebunden sein. Das Gesamtvolumen der magnetischen Partikel 18 ist im Verhältnis zum maximalen Volumen der ersten oder zweiten Kammer klein. Die in Fig. 3a gezeigte Vorrichtung ist, ggf. auch unter Weglassung der Schubstangen 14, eine mögliche Lieferform. Die Vorrichtung kann als Einwegkassette in eine entsprechende Einrichtung zur automatischen Betätigung der Kolben 4, 5 eingesetzt werden. Im Weiteren wird auf die einzelnen Verfahrensschritte eingegangen.

In Fig. 3b ist ein den ersten Anschluss 7 verschließender Kunststofffilm oder Septum (hier nicht gezeigt) mit der Injektionsnadel einer Injektionsspritze 19 durchstoßen. In der Injektionsspritze 19 ist Probenflüssigkeit P aufgenommen. Es wird mittels einer der Schubstangen 14 der zweite Kolben 5 festgehalten. Gleichzeitig wird mittels der Injektionsspritze 19 die Probenflüssigkeit P in den ersten Kanal 6 gedrückt. Der erste Kolben 4 wird nicht festgehalten; er ist verschiebbar. Infolgedessen wird die Probenflüssigkeit P - wie in Fig. 3c gezeigt ist - in die erste Kammer 2 gedrückt. Anschließend wird der Anschluss 7 verschlossen. Das kann beispielsweise durch ein hier nicht gezeigtes Ventil, z. B. ein Ventil, welches eine Strömung nur in eine Richtung ermöglicht, erfolgen.

Die Lyseflüssigkeit L und die Probenflüssigkeit P werden dann durch wechselweise Bewegung des ersten 4 und des zweiten Kolbens 5 in Richtung des ersten 6 bzw. des zweiten Kanals 8 über den Verbindungskanal 10 zwischen der ersten 2 und der

zweiten Kammer 3 hin- und hergepumpt. Die Bewegung der Kolben 4, 5 erfolgt durch abwechselnde Aktivierung der Schubstangen 14. Die jeweils nicht aktivierte Schubstange 14 übt dann keinen Widerstand gegen die Bewegung des jeweiligen Kolbens 4, 5 aus. D.h., durch Drücken des ersten 4 bzw. des zweiten Kolbens 5 in Richtung des ersten 6 bzw. zweiten Kanals 8 wird der jeweils andere Kolben durch die in die jeweils andere Kammer gedrückte Flüssigkeit zurück bewegt. Durch das Hin- und Herbewegen der Flüssigkeit wird die Lyseflüssigkeit L mit der Probenflüssigkeit P intensiv gemischt. Die Probenflüssigkeit P erfährt beim Hindurchdrücken durch die Kanäle 6, 8, 10 eine extreme Beschleunigung. Die dabei erzeugten Scherkräfte unterstützen den Aufschluss der organischen Substanz und die Freisetzung der Biopolymere, z. B. DNA. In der Probenflüssigkeit P befinden sich nun z. B. Zellbruchstücke und DNA. Die DNA bindet an die frei in der Probenflüssigkeit P beweglichen magnetischen Partikel 18.

Anschließend wird beispielsweise über einem in der Nähe der Öffnung des zweiten Kanals 8 befindlichen Abschnitt der zweiten Kammer 3 mittels eines Magneten 20 ein Magnetfeld angelegt. Infolgedessen werden die magnetischen Partikel 18 mit den daran gebundenen Biopolymeren in diesem Abschnitt gehalten. Das Volumen der Probenflüssigkeit in der zweiten Kammer wird durch Niederdrücken des zweiten Kolbens 5 auf den Abschnitt verkleinert, in dem die magnetischen Partikel 18 fixiert sind. Das Restvolumen der Probenflüssigkeit wird um ein Vielfaches verkleinert gegenüber deren Ausgangsvolumen. Das Restvolumen beträgt zweckmäßigerweise zwischen 1 bis 100  $\mu$ l.

Dann wird das Magnetfeld entfernt. Das kann z. B. durch Entfernen des Magneten 20 geschehen. Das kann aber auch dadurch geschehen, dass ein ggf. vorhandener Elektromagnet abgeschaltet wird. Der zweite Anschluss 9 wird geöffnet. Anschließend kann - wie in Fig. 3h gezeigt - durch weiteres Niederdrücken

des zweiten Kolbens 5 das die magnetischen Partikel 18 mit den daran gebundenen Biopolymeren enthaltene verbliebene Probenvolumen durch den zweiten Anschluss 9 entleert werden.

5 In Zusammensicht mit Fig. 2 wird deutlich, dass auch eine andere Verfahrensführung möglich ist. Das Verfahren kann auch so geführt werden, dass die jeweils in Fig. 3h gezeigte in der ersten Kammer 2 aufgenommene zu verwerfende Probenflüssigkeit in eine besondere weitere Kammer 15 zur Aufnahme solcher Flüssigkeiten gepumpt wird. In Fig. 2 handelt es sich  
10 dabei um die mittlere Kammer. Nach dem Aufschluss der organischen Substanz kann mit der in Fig. 2 gezeigten Vorrichtung ein Waschpuffer durch Hin- und Herbewegen der entsprechenden Kolben mit der die magnetischen Partikel 18 enthaltenden Probenflüssigkeit P gemischt werden. Analog zu dem in Fig. 3 be-  
15 schriebenen Verfahren können die magnetischen Partikel 18 in einem Restvolumen angereichert werden und anschließend durch Hin- und Herbewegen der entsprechenden Kolben mit einer Elutionsflüssigkeit E gemischt werden. Bei der Elutionsflüssigkeit E kann es sich um reines oder gepuffertes, niedrig-Salz-  
20 haltiges Wasser handeln. Je nach Art der verwendeten Beschichtung der magnetischen Partikel 18 können der Lösung auch pH-aktive Stoffe, chaotrope Stoffe, Chelatoren, Phosphat, Liganden, Liganden-Analoga oder Peptide zugesetzt sein,  
25 welche Biopolymere freisetzen. - Anstelle einer Elution unter Verwendung einer Elutionsflüssigkeit ist es aber auch denkbar, die Temperatur zu erhöhen. Auch damit kann eine Elution erreicht werden. Durch die Behandlung mit der Elutionsflüssigkeit E werden die Biopolymere von den magnetischen Partikeln 18 gelöst. Die magnetischen Partikel 18 können durch An-  
30 legen eines Magnetfelds beispielsweise in der zweiten Kammer 3 zurückgehalten werden, während die Biopolymere enthaltende Elutionsflüssigkeit E durch den zweiten Anschluss 9 entladen wird. Es hat sich als zweckmäßigerweise erwiesen, die Eluti-

onsflüssigkeit E auf ein Volumen von 5 bis 100  $\mu$ l zu reduzieren.

5 Nachfolgend wird ein Versuchsprotokoll unter Verwendung der in Fig. 1 gezeigten ersten Vorrichtung näher erläutert. Zunächst wird mit einer Injektionsspritze entionisiertes Wasser über den zweiten Anschluss 9 zugeführt, um Luft aus den Kanälen 6, 8, 10 und den Kammern 2, 3 zu entfernen. Zum vollständigen Entlüften wird die Vorrichtung in eine geeignete Aufnahme einer automatischen Analysevorrichtung eingelegt. Mit einer solchen Vorrichtung werden die Kolben 4, 5 gemäß einem vorgegebenen Programm bewegt und ggf. vorgesehene Ventile geöffnet und geschlossen.

15 Zunächst wird das in den Kammern 2, 3 befindliche Wasser durch Bewegen der Kolben 4, 5 durch den ersten Anschluss 7 herausgedrückt. Anschließend wird die erste Kammer 2 über den zweiten Anschluss 9 mit einer Mischung befüllt, welche 125  $\mu$ l Lysepuffer, 360  $\mu$ l Bindingpuffer und 14  $\mu$ l einer Suspension  
20 von magnetischen Beads 18 enthält. Die Puffer und die magnetischen Beads stammen aus: "chemagic DNA Blood 100 Kit" Bestell-Nr. 01-01-1001 der Firma Chemagen. Dann wird als Probe 100  $\mu$ l in der Gerinnung, z. B. durch EDTA (Ethylendiamintetraacetat) gehemmtes, Blut in die erste Kammer 2 über den  
25 zweiten Anschluss 9 zugeführt. Der zweite Anschluss 9 wird geschlossen. Anschließend wird bedingt durch abwechselndes Eindrücken des ersten 4 und zweiten 5 Kolbens die aus der Probe und der Mischung bestehende Flüssigkeit zwischen der ersten 2 und der zweiten Kammer 3 etwa 10 mal hin- und hergepumpt. Die erste Kammer 2 wird 5 Minuten bei Raumtemperatur  
30 inkubiert. Es wird dann in der Kammer in der Nähe des Ausgangs ein Magnetfeld angelegt, derart, dass die magnetischen Beads 18 in diesem Bereich festgehalten werden. Die in der ersten Kammer 2 enthaltene Flüssigkeit wird durch den ersten  
35 Anschluss 7 entfernt. Die kegelartige Aussparung der ersten

Kammer 2 in der Nähe des ersten Kanals 6 ist so ausgeführt, dass darin das Volumen der magnetischen Beads 18 aufgenommen werden kann.

- 5    Anschließend werden 300  $\mu$ l eines Waschpuffers P3 des vorge-  
nannten Kits über den zweiten Anschluss 9 in die erste Kammer  
2 zugeführt. Durch wechselweises Bewegen des ersten 4 und  
zweiten Kolbens 5 wird der Waschpuffer P3 mit den magneti-  
schen Beads 18 etwa 10 mal zwischen der ersten 2 und der  
10 zweiten Kammer 3 hin- und hergepumpt. Ein Magnetfeld liegt  
dabei nicht an. Es wird eine intensive Durchmischung der ma-  
gnetischen Beads und des Waschpuffers P3 gewährleistet.

- Anschließend wird im Bereich der kegelartig ausgeführten Aus-  
sparung der ersten Kammer 2 wiederum ein Magnetfeld angelegt,  
15 so dass dort die magnetischen Beads 18 gehalten werden. Der  
Waschpuffer P3 wird über den ersten Anschluss 7 entladen. Der  
beschriebene Waschvorgang kann einmal wiederholt werden. An-  
schließend wird mit einem weiteren Waschpuffer P4 des vorge-  
20 nannten Kits gewaschen.

- Anschließend werden 600  $\mu$ l eines Waschpuffers P5 des vorge-  
nannten Kits bei anliegendem Magnetfeld langsam über den  
zweiten Anschluss 9 in die erste Kammer 2 gefüllt. Beim Be-  
füllen ist darauf zu achten, dass ein aus den magnetischen  
25 Beads 18 gebildetes Aggregat möglichst erhalten bleibt. Nach  
etwa 1,5 Minuten wird der Waschpuffer P5 über den ersten An-  
schluss 7 entladen. Es können also nacheinander verschiedene  
Waschpuffer verwendet werden. Die Auswahl der Waschpuffer und  
30 die Anzahl der durchzuführenden Behandlungen mit den Wasch-  
puffern richtet sich nach der jeweils verwendeten Probenflüs-  
sigkeit.

- Anschließend werden über den zweiten Anschluss 9 100  $\mu$ l Elu-  
35 tionspuffer des Kits in die erste Kammer 2 gefüllt, wobei das

Magnetfeld nicht mehr anliegt. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die magnetischen Beads 18 durch wiederholtes Aktivieren des Magnetfelds, vorzugsweise unter Änderung der Feldstärke des Magnetfelds, mit dem Elutionspuffer in der ersten Kammer 2 gemischt. Das Magnetfeld wird für eine Dauer von 5 Minuten angelegt und anschließend das Eluat über den ersten Anschluss 7 entladen. Der Nachweis der im Eluat enthaltenen Biopolymere kann beispielsweise mit einer Light-Cycler-PCR erfolgen. Dabei zeigt sich, dass das Eluat ohne weiteres einer PCR zugänglich ist. Das Eluat ist insbesondere frei von PCR-Inhibitoren.

Insgesamt ist festzustellen, dass das vorgeschlagene Verfahren einfach und kostengünstig durchführbar ist. Die Probe kann hermetisch abgeschlossen von der Umwelt in einer einzigen, vorzugsweise als Einwegvorrichtung, ausgebildeten Kassette aufbereitet werden. Zur Erleichterung des Verfahrens können in den in der Kassette vorgesehenen Kammern bereits die zum Probenaufschluss und zur Anreicherung der darin enthaltenen Biopolymere erforderlichen Lösungen und/oder magnetischen Beads vorgelegt sein. In diesem Fall muss lediglich noch ein vorgegebenes Probenvolumen zugegeben werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der Probe und/oder der Verwendung ungeeigneter Konzentrationen der zum Aufschluss der Probe verwendeten Lösungen oder dgl. wird vermieden. Das Eluat kann ohne weiteres, insbesondere automatisch und ebenfalls unter hermetischem Abschluss, unmittelbar einer PCR-Analysenvorrichtung zugeführt werden. Damit ist es möglich, die Probenaufbereitung und die Analyse insgesamt so durchzuführen, dass ein Eingriff von Laborpersonal lediglich zum Aufgeben der Probe erforderlich ist.

## Bezugszeichenliste

	1	Behälter
	2	erste Kammer
5	3	zweite Kammer
	4	erster Kolben
	5	zweiter Kolben
	6	erster Kanal
	7	erster Anschluss
10	8	zweiter Kanal
	9	zweiter Anschluss
	10	Verbindungskanal
	11	dritter Anschluss
	12	dritter Kanal
15	13	Durchbrüche
	14	Schubstangen
	15	weitere Kammern
	16	weitere Kolben
	17	weitere Kanäle
20	18	magnetische Partikel
	19	Injektionsspritze
	20	Magnet
	P	Probenflüssigkeit
25	L	Lyseflüssigkeit
	W	Waschflüssigkeit
	E	Elutionsflüssigkeit

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zur kontaminationsfreien Aufbereitung Biopolymer-haltiger Probenflüssigkeiten (P),

5

mit einer ersten (2) und einer zweiten Kammer (3), die über einen Kanal (6, 8, 10) verbunden sind,

10

wobei die erste Kammer (2) ein Mittel (4) zum reversiblen Verändern ihres Volumens und die zweite Kammer (3) ein reversibel veränderbares Volumen aufweist,

15

wobei ein mit dem Kanal (6, 8, 10) oder einer der Kammern (2, 3) verbundener Anschluss (7, 9) zum Beladen der ersten (2) oder der zweiten Kammer (3) mit einer Probenflüssigkeit vorgesehen ist und

20

wobei die Kammern (2, 3) und der Kanal (6, 8, 10) als Einwegvorrichtung ausgebildet sind.

25

2. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Einwegvorrichtung ein nach Art einer Einwegkassette ausgebildetes Gehäuse (1) aufweist, welches vorzugsweise aus Kunststoff hergestellt ist.

30

3. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste Kammer (2) als erster Zylinder ausgeführt ist, und das Mittel zum Verändern des Volumens ein im ersten Zylinder geführter erster Kolben (4) ist.

4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zweite Kammer (3) als zweiter Zylinder mit einem darin geführten zweiten Kolben (5) ausgeführt ist.



5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kolben (4, 5) gegen ein vollständiges Herausziehen aus den Zylindern mechanisch gesichert sind.
- 5 6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der erste und der zweite Zylinder sich zum Rand des Gehäuses (1) hin öffnen, so dass die Kolben (4, 5) von außen her betätigbar sind.
- 10 7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei von einem dem ersten Kolben (4) gegenüberliegenden Ende des ersten Zylinders ein erster Kanal (6) sich erstreckt, der mit einem am Gehäuse (1) vorgesehenen ersten Anschluss (7) verbunden ist.
- 15 8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei von einem dem zweiten Kolben (4) gegenüberliegenden Ende des zweiten Zylinders ein zweiter Kanal (8) sich erstreckt, der mit dem ersten Kanal (6) oder der ersten Kammer (2) verbunden ist.
- 20 9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei am Gehäuse (1) ein mit dem zweiten Kanal (8) in Verbindung stehender zweiter Anschluss (9) vorgesehen ist.
- 25 10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens eine weitere Kammer (15) mit einem, vorzugsweise reversibel, veränderbaren Volumen vorgesehen ist, die über den ersten (6) oder zweiten Kanal (8) mit der ersten (2) und/oder zweiten Kammer (3) verbunden ist.
- 30 11. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die weitere Kammer (15) als ein im Gehäuse (1) vorgesehener weiterer Zylinder mit einem darin geführten weiteren Kolben (16) ausgebildet ist, der an einem dem weiteren Kolben
- 35

(16) gegenüberliegenden Ende einen weiteren Kanal (17) aufweist, der mit dem ersten (6) und/oder zweiten Kanal (8) verbunden ist.

5 12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Achsen der Zylinder in einer Ebene liegen.

13. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Achsen der Zylinder parallel angeordnet sind.

10

14. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in einer der Kammern (2, 3, 15) eine Flüssigkeit (L) zum Aufschließen von die Biopolymere enthaltender organischer Substanz, insbesondere Zellen, aufgenommen ist.

15

15. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in einer der Kammern (2, 3, 15) oder im Kanal (6, 8, 10) magnetische Partikel (18) aufgenommen sind, die an ihrer Oberfläche Biopolymere binden können.

20

16. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die magnetischen Partikel (18) einen Durchmesser im Bereich von 50 nm bis 50  $\mu$ m, vorzugsweise von 200nm bis 20 $\mu$ m, aufweisen.

25

17. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Durchmesser der magnetischen Partikel (18) kleiner ist als ein Durchmesser der Kanäle (6, 8, 10, 17), so dass die magnetischen Partikel (18) durch die Kanäle (6, 8, 10, 17) bewegbar sind.

30

18. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Verhältnis des Durchmessers der magnetischen Partikel (18) zum Durchmesser des Kanals/der Kanäle (6, 8, 10, 17)

kleiner als 1:5, vorzugsweise kleiner als 1:10, besonders vorzugsweise kleiner als 1:50, ist.

5 19. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in einer der Kammern (2, 3, 15) eine Elutionsflüssigkeit (E) aufgenommen ist.

10 20. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest in einer der Kammern (2, 3, 15) eine Waschflüssigkeit (W) aufgenommen ist.

15 21. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der/die Anschluss/Anschlüsse (7, 9) jeweils mit einem Verschluss verschließbar ist/sind.

20 22. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der/die Anschluss/Anschlüsse (7, 9) mindestens ein Ventil zum wahlweisen Verschließen eines Anschlusses oder Kanals (6, 8, 10, 17) vorgesehen ist.

25 23. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei geschlossenem/n Anschluss/Anschlüssen die Kammern (2, 3, 15) flüssigkeitsdicht gegenüber der Umgebung abschlossen sind.

30 24. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gehäuse (1) ein Mittel (13) zum Anbringen in einer korrespondierenden Aufnahme einer Einrichtung zum automatischen Ändern des Volumens mindestens einer der Kammern aufweist.

35 25. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kanäle (6, 8, 10) und/oder die Kammern (2, 3, 15) mit Flüssigkeit gefüllt sind.

26. Verfahren zum kontaminationsfreien Aufbereiten Biopolymer-haltiger Probenflüssigkeiten (P) mit einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 bis 24 mit folgenden Schritten:

5    Einführen eines vorgegeben Volumens der Probenflüssigkeit (P) durch den ersten Anschluss (7) in die erste (2) oder die zweite Kammer (3),

10    Unterbrechung einer durch den ersten Anschluss (7) gerichteten Strömung ,

15    Hin- und Herbewegen der Probenflüssigkeit (P) zwischen der ersten (2) und der zweiten Kammer (3), so dass die Probenflüssigkeit (P) mit magnetischen Partikeln (18) gemischt wird und die in der Probenflüssigkeit (P) enthaltenen Biopolymere an die magnetischen Partikel (18) gebunden werden,

Entladen der Biopolymere über einen Anschluss (7, 9).

20    27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei zur Unterbrechung der durch den ersten Anschluss (7) gerichteten Strömung der erste Anschluss (7) verschlossen wird.

25    28. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 oder 27, wobei die Biopolymere Nukleinsäuren sind.

30    29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 28, wobei die Biopolymere über den ersten Anschluss (7) oder den zweiten Anschluss (9) entladen werden.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29, wobei die Biopolymere gebunden an die magnetischen Partikel (18) oder getrennt von den magnetischen Partikeln (18) entladen werden.

31. Verfahren nach Anspruch 26 bis 30, wobei die magnetischen Partikel (18) in einer der Kammern (2, 3) vorgelegt sind.

5 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 31, wobei die Probenflüssigkeit (P) durch abwechselndes Vergrößern und Verkleinern des Volumens der ersten Kammer (2) hin- und herbewegt wird.

10 33. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 32, wobei die Probenflüssigkeit (P) durch abwechselndes Drücken des ersten (4) und zweiten Kolbens (5) hin- und herbewegt wird.

15 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 33, wobei die Probenflüssigkeit (P) zum Aufschließen mit Ultraschall behandelt wird.

20 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 34, wobei die Probenflüssigkeit (P) zum Aufschließen mit einer, vorzugsweise in einer der Kammern (2, 3) vorgelegten, Flüssigkeit (L) zum Aufschließen gemischt wird.

25 36. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 35, wobei die magnetischen Partikel (18) mit den daran gebundenen Biopolymeren durch Erzeugen eines Magnetfelds in einem vorgegebenen Abschnitt einer, vorzugsweise der ersten (2) oder zweiten, Kammer (3) gehalten und dann eine um den an die magnetischen Partikel (18) gebundenen Anteil der Biopolymere verarmte Restflüssigkeit (R) aus der betreffenden Kammer (2, 3) zu einem wesentlichen Teil entfernt wird.

30 37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei der vorgegebene Abschnitt in der Nähe der Öffnung des Kanals (6, 8) sich befindet.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37, wobei eine in einer weiteren Kammer (15) vorgelegte Waschflüssigkeit (W) mit den magnetischen Partikeln (18), vorzugsweise durch Hin- und Herbewegen zwischen der Kammer (2, 3) und der weiteren Kammer (15), gemischt wird.

39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die magnetischen Partikel (18) durch erneutes Erzeugen eines Magnetfelds in dem vorgegebenen Abschnitt gehalten und dann die Waschflüssigkeit (W) aus der betreffenden Kammer (2, 3) zu einem wesentlichen Teil entfernt wird.

40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei eine in einer weiteren Kammer (15) vorgelegte Elutionsflüssigkeit (E) mit den magnetischen Partikeln (18), vorzugsweise durch Hin- und Herbewegen der Elutionsflüssigkeit (E) zwischen der Kammer (2, 3) und der weiteren Kammer (15), gemischt wird.

41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei die magnetischen Partikel (18) durch erneutes Erzeugen eines Magnetfelds in dem vorgegebenen Abschnitt gehalten und dann die die Biopolymere enthaltende Elutionsflüssigkeit (E) aus der betreffenden Kammer zu einem wesentlichen Teil entladen wird.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 41, wobei zu verwerfende Proben- (P), Rest- (R), Waschflüssigkeit (W) oder die magnetischen Partikel in einer der Kammern (2, 3, 15) gesammelt und nach dem Entladen, vorzugsweise zusammen mit dem Gehäuse (1), verworfen wird/werden.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 42, wobei außer der Probenflüssigkeit keine weitere Flüssigkeit in das aus den Kammern (2, 3, 15) und Kanälen (6, 8, 10) gebildete System eingeführt wird.

1/4

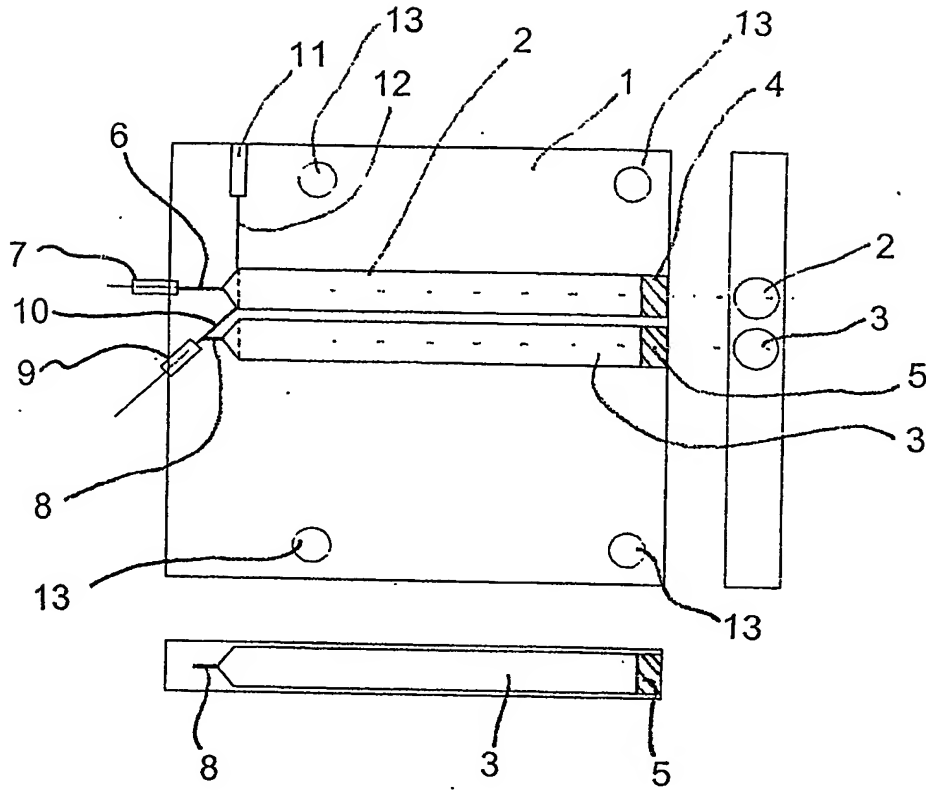


Fig. 1

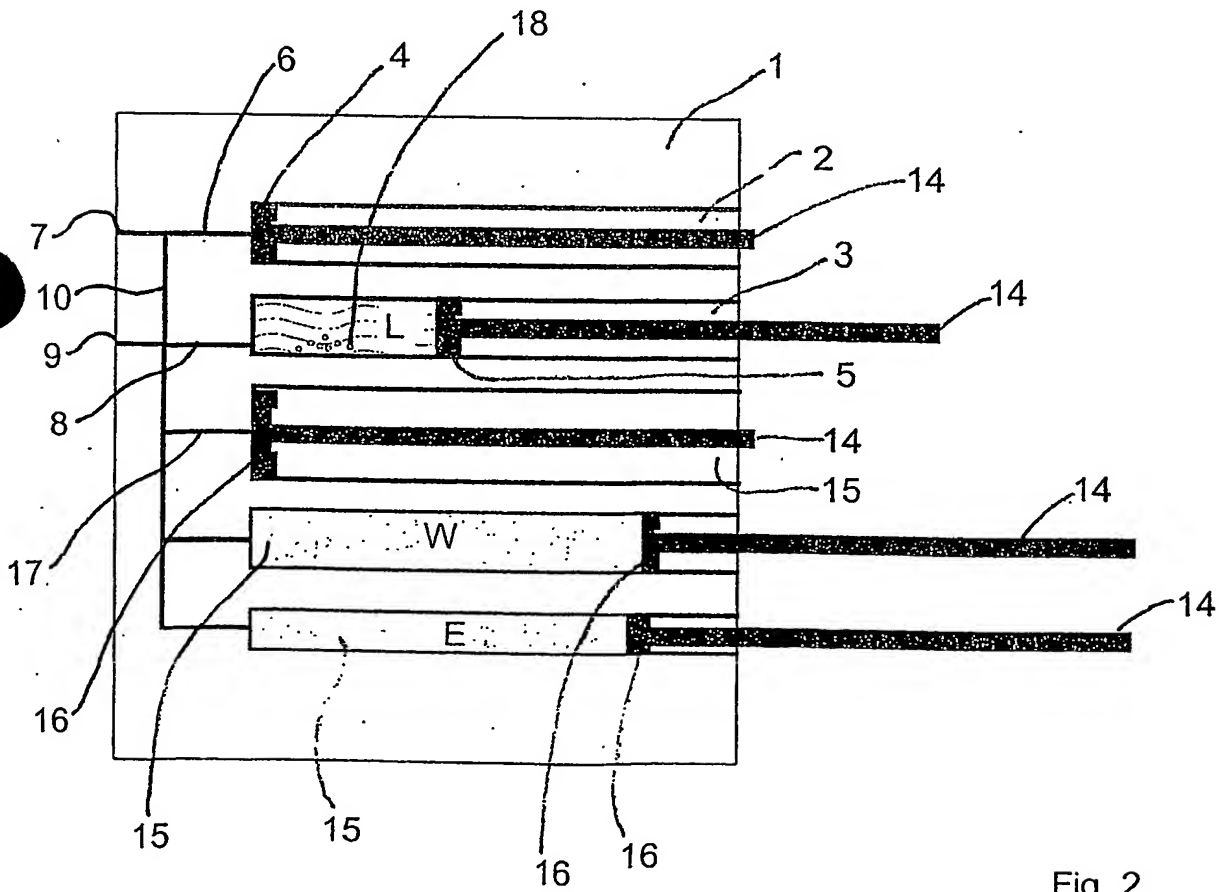
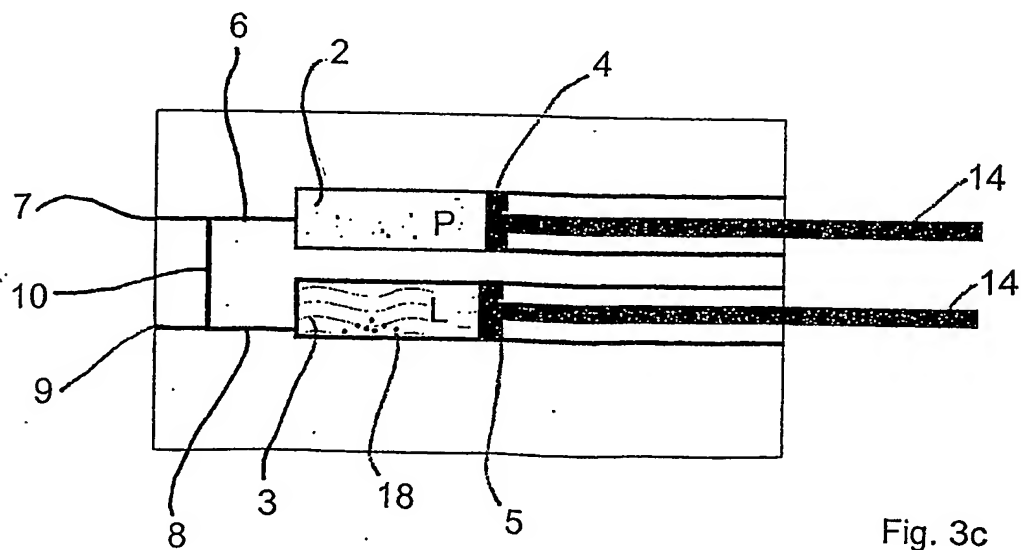
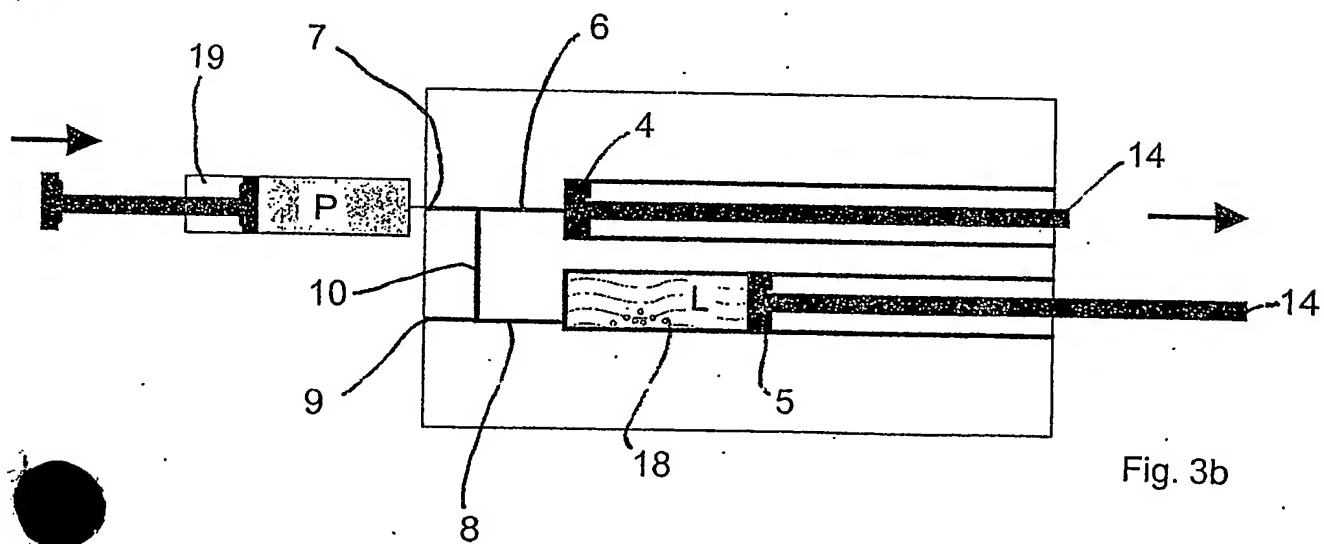


Fig. 2





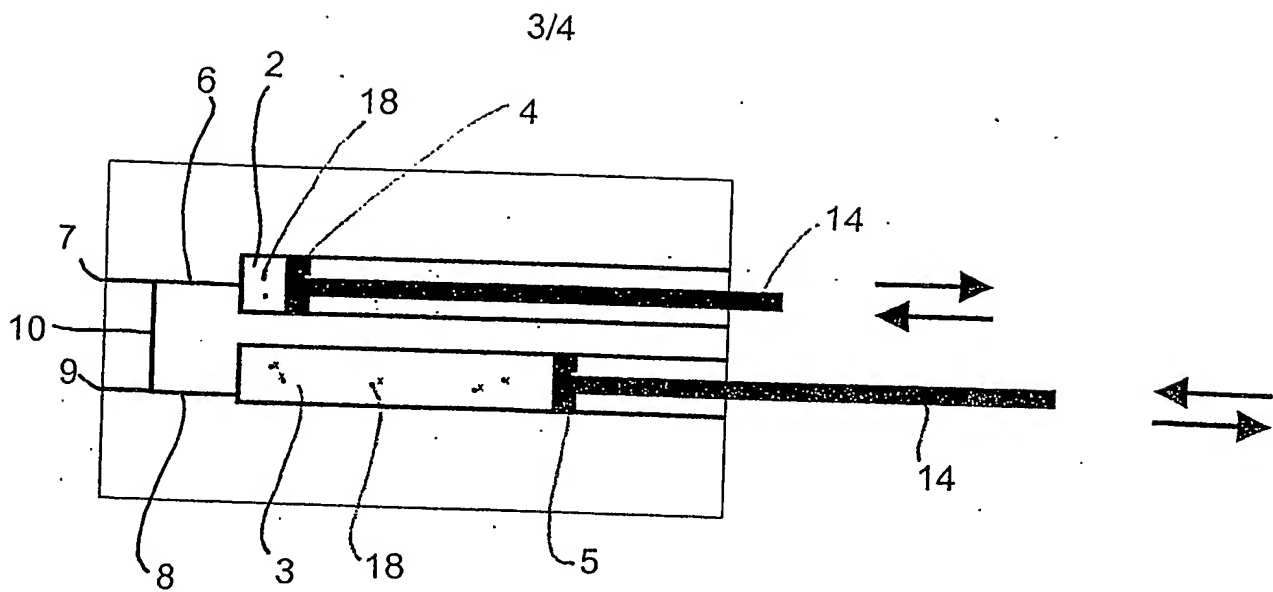


Fig. 3d

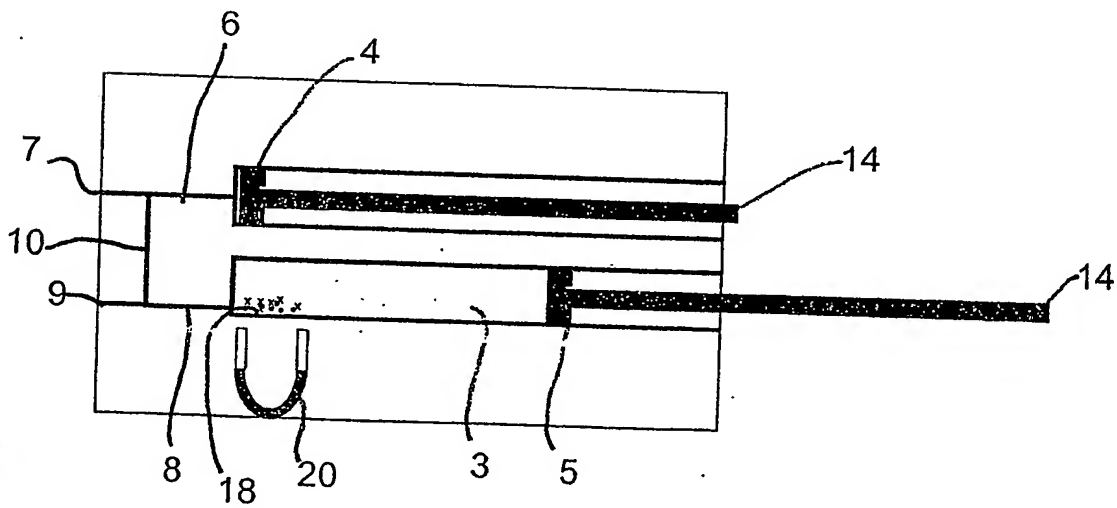


Fig. 3e

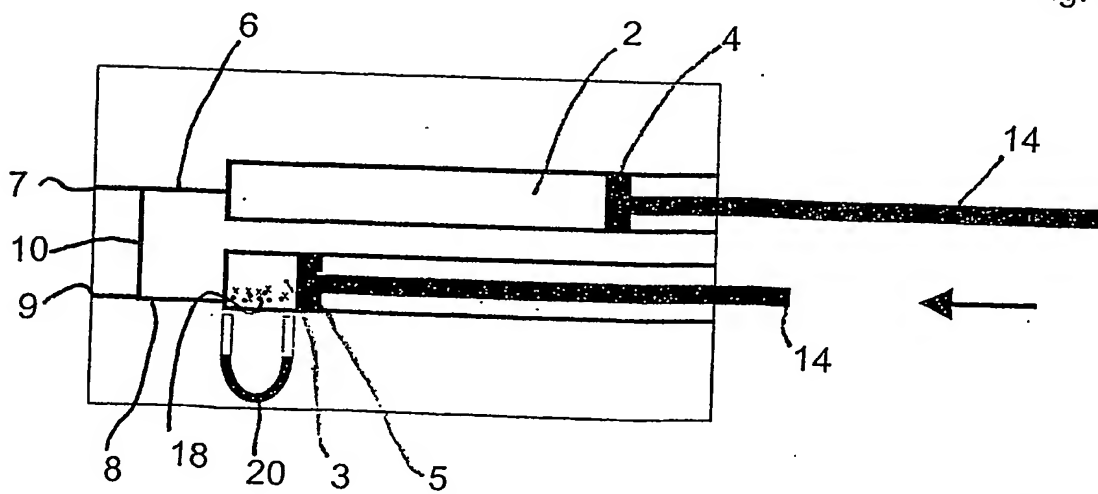


Fig. 3f

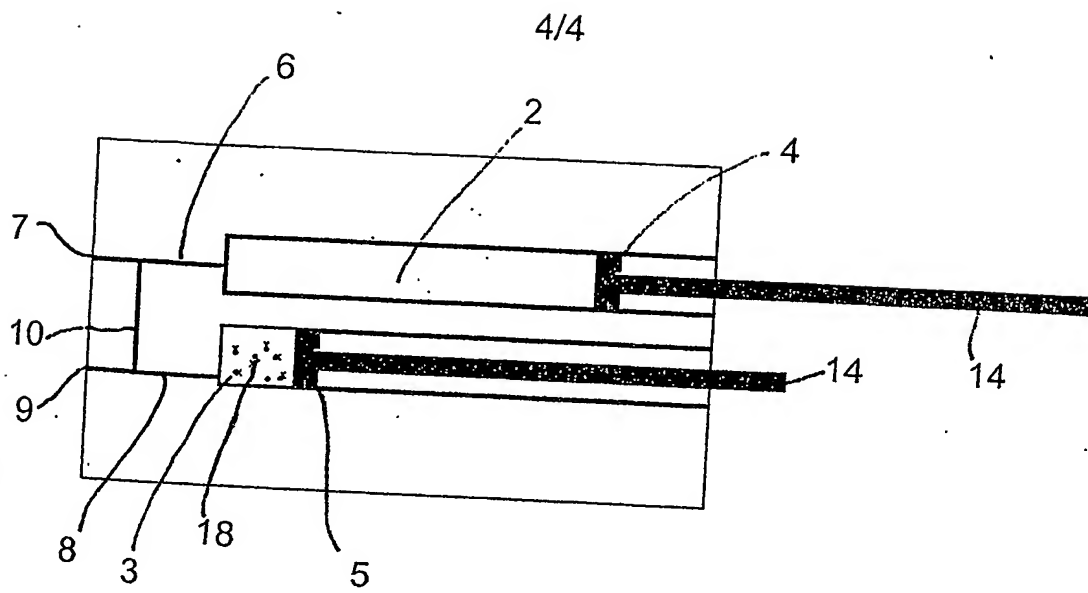


Fig. 3g

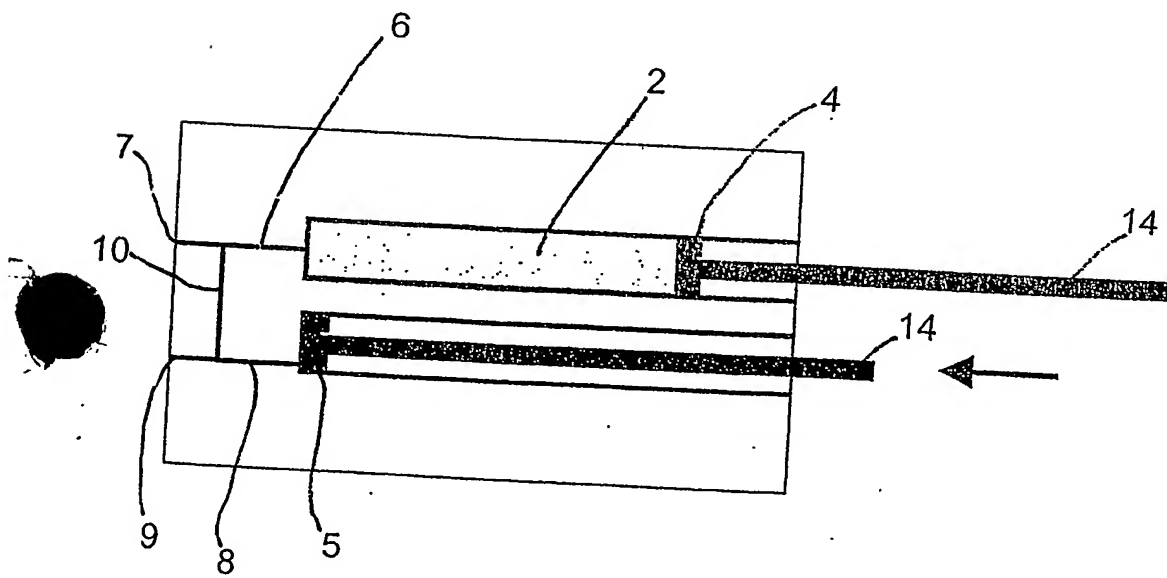


Fig. 3h

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur kontaminations-  
freien Aufbereitung Biopolymer-haltiger Probenflüssigkeiten  
5 (P),

mit einer ersten (2) und einer zweiten Kammer (3), die über  
einen Kanal (6, 8, 10) verbunden sind,

10 wobei die erste Kammer (2) ein Mittel (4) zum reversiblen  
Verändern ihres Volumens und die zweite Kammer (3) ein rever-  
sibel veränderbares Volumen aufweist,

wobei ein mit dem Kanal (6, 8, 10) oder einer der Kammern (2,  
15 3) verbundener Anschluss (7, 9) zum Beladen der ersten (2)  
oder der zweiten Kammer (3) mit einer Probenflüssigkeit vor-  
gesehen ist und

wobei die Kammern (2, 3) und der Kanal (6, 8, 10) als Einweg-  
20 vorrichtung ausgebildet sind.

Fig. 3a

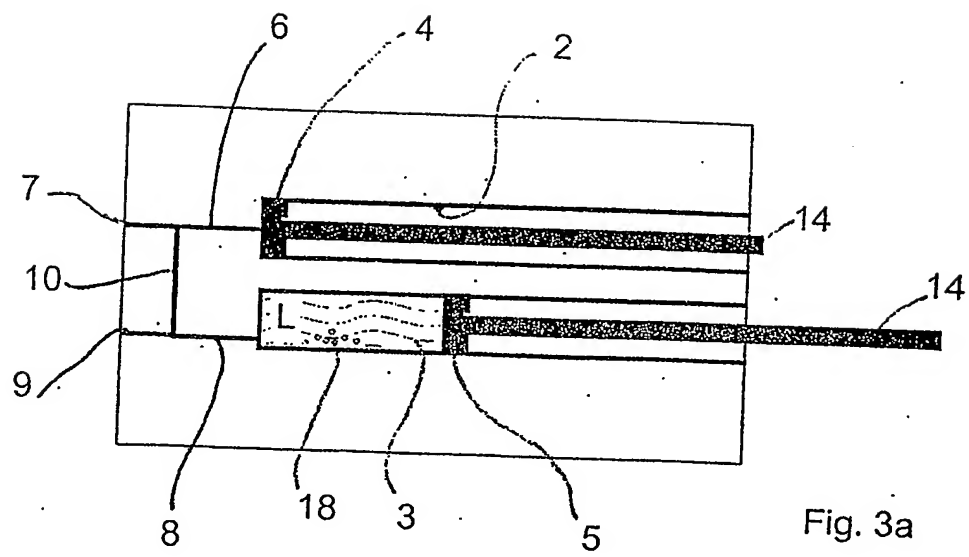


Fig. 3a